

201423005A

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服実用化研究事業(肝炎等克服緊急対策研究事業)）

C型肝炎を含む代謝関連肝がんの 病態解明及び治療法の開発等に関する研究

(H24-肝炎-一般-006)

平成26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 **小池和彦**

東京大学医学部消化器内科学 教授

平成27(2015)年3月

厚生労働科学研究費補助金
肝炎等克服実用化研究事業
(肝炎等克服緊急対策研究事業)

**C型肝炎を含む代謝関連肝がんの病態解明及び
治療法の開発等に関する研究**

(H24 ー肝炎ー一般ー 006)

平成 26 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 **小池 和彦**
東京大学医学部消化器内科 教授

平成 27 (2015) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金

肝炎等克服実用化研究事業（肝炎等克服緊急対策研究事業）

「C型肝炎を含む代謝関連肝がんの病態解明及び治療法の開発等に関する研究」班

平成26年度 班の構成

- 小池 和彦 東京大学医学部消化器内科学・教授
- 岡上 武 大阪府済生会医療福祉センター・総長
- 西原 利治 高知大学教育研究部医療学系医学部門臨床医学系消化器内科・教授
- 橋本 悦子 東京女子医科大学消化器内科・教授
- 田中 真二 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科分子腫瘍医学・教授
- 植木浩二郎 東京大学医学部分子糖尿病学・特任教授
- 芥田 憲夫 虎の門病院肝臓センター・医長
- 川口 巧 久留米大学医学部消化器疾患情報講座・講師
- 松浦 善治 大阪大学微生物病研究所分子ウイルス分野・教授
- 勝二 郁夫 神戸大学大学院医学系研究科微生物学分野・准教授
- 森屋 恭爾 東京大学医学部感染制御学・教授
- 建石 良介 東京大学医学部消化器内科学・特任講師

目 次

I. 総括研究報告

C型肝炎を含む代謝関連肝がんの病態解明及び
治療法の開発等に関する研究

小池 和彦 1

II. 分担研究報告

1. NASH, C型肝炎の発症・進展における遺伝的要因の研究 21
岡上 武
2. Steatohepatic hepatocellular carcinoma 臨床病理学的特徴に
関する検討 28
橋本 悦子
3. HCV および NASH による代謝パスウェイ異常と
肝細胞癌の関連解析 34
田中 真二
4. 肝発癌における PPAR- α の役割に関する研究 38
西原 利治
5. インスリン抵抗性と NASH 病態の分子機構の解明に関する研究 42
植木浩二郎
6. C型肝炎肝発癌における代謝要因・ウイルス要因の影響 45
芥田 憲夫
7. 非アルコール性脂肪性肝炎関連肝がんマウスモデルにおける
DPP4 阻害剤の肝がん抑制効果に関する研究 49
川口 巧

8. アポリポ蛋白質の両親媒性 α ヘリックスは HCV の感染性粒子産生に關与する.....	56
松浦 善治	
9. C 型肝炎ウイルス感染培養系による C 型肝炎關連肝がんと 代謝因子に關する研究	60
勝二 郁夫	
10. C 型肝炎關連肝癌と代謝因子	65
森屋 恭爾	
11. 肝細胞がん患者において体組成が予後に与える影響に關する研究 ..	68
建石 良介	
III. 研究成果に關連した刊行物 (總説抜粋)	71

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服実用化研究事業（肝炎等克服緊急対策研究事業））

総括研究報告書

C型肝炎を含む代謝関連肝がんの病態解明及び 治療法の開発等に関する研究

研究代表者 小池 和彦

東京大学消化器内科学 教授

研究要旨

肝細胞癌へ進展する慢性肝疾患は、我が国の保健行政、医療上の最大の問題であり、現在でもなお年間 3 万人余が肝細胞癌（肝癌）で死亡している。C 型、B 型肝炎に関連した肝癌が多くを占めるが、最近では、C 型、B 型肝炎ともに陰性である『非 B 非 C 型肝癌』の増加傾向が見られ、対策確立が急務である。非 B 非 C 型肝癌の中では、アルコール性肝硬変（ASH）合併肝癌に加え、肥満、代謝異常と関連とする非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）合併肝癌の増加が著しい。また、糖尿病患者の癌では肝癌が最も多いが、高リスク群の設定はできていない。アルコール摂取量からは ASH と NASH のどちらにも属さない非 B 非 C 型肝癌の存在と増加も大きな問題である（非 ASH 非 NASH 非 B 非 C 型肝癌）。また、C 型肝炎関連肝癌においては、肥満、糖・脂質代謝異常という代謝関連異常が肝癌発生の促進因子であることが示されてきている。そこで、C 型肝炎、NASH、非 ASH 非 NASH の非 B 非 C 型肝疾患に関連する肝癌を、「代謝関連肝癌 (Metabolism-associated liver cancer, MALC)」として捉えて解析を行ない、その病態を探り、高リスク群を設定し、これらの疾患の病態解明を試みた。班全体研究として、日本における非 B 非 C 型肝癌の実態調査を行なった。16 の臨床データを用いた階層別クラスタリングによって非 B 非 C 型肝癌は 5 つのカテゴリーに分別できた。近年の増加はカテゴリー1(高齢中等度飲酒男性)、5(非飲酒メタボリック男性)によるものであった。すなわち、従来考えられてきた「高度飲酒」群や「NASH」とは異なったカテゴリーの、より一般的といえる「軽度肥満、軽度〜中等度飲酒」の男性が肝癌のリスクに曝されていることが初めて明らかとなった。また、個別研究としては、遺伝子 *patatin like phospholipase containing 3*(*PNPLA3*)は type 4 NASH に特異的であり、かつ発癌感受性遺伝子である事、また、この *PNPLA3* 遺伝子が C 型肝炎の発生に関与していることをはじめとして、C 型肝炎、NASH、NAFLD、アルコール性肝癌に関する多くの成果を挙げることができた。我が国の今後の肝疾患診療、保健行政において大きな貢献を果たすことができた。

分担研究者（所属施設名・職名）

西原利治（高知大学教育研究部医療学系医学部門臨床医学系消化器内科・教授）

岡上 武（大阪府済生会医療福祉センター・総長）

植木浩二郎（東京大学医学部附属病院分子糖尿病学・特任教授）

橋本悦子（東京女子医科大学消化器内科・教授）

芥田憲夫（虎の門病院肝臓センター・医長）

田中真二（東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科・教授）

川口 巧（久留米大学医学部消化器疾患情報講座・講師）

松浦善治（大阪大学微生物病研究所分子ウ

イルス分野・教授)

勝二郁夫 (神戸大学大学院医学系研究科微生物学分野・准教授)

森屋恭爾 (東京大学医学部感染制御学・教授)

建石良介 (東京大学医学部消化器内科・特任講師)

A. 研究目的

肝細胞癌へ進展する慢性肝疾患は、我が国の保健行政、医療の最大の問題であり、なお年間3万4千人が死亡する。C型、B型肝炎に関連した癌が多くを占めるが、両者陰性の「非B非C型肝炎」の増加傾向があり対策確立が急務である。非B非C型肝炎の中では、アルコール性肝硬変(ASH)合併肝癌に加え、肥満、代謝異常と関連とする非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) 合併肝癌の増加が著しい。糖尿病では肝癌が多いが高リスク患者は不明である。飲酒量ではASHとNASHのどちらにも属さない非B非C型肝炎の増加も問題である(非ASH非NASH非B非C型肝炎)。一方、C型関連肝癌においては、肥満、糖・脂質代謝異常という代謝関連異常が肝癌発生の促進因子である。そこで、C型肝炎、NASH、非ASH非NASHの非B非C型肝炎疾患に関連する肝癌を、代謝関連肝癌(Metabolism-associated liver cancer, MALC)として捉えて解析を行ない、その病態を探り、高リスク群を設定し、さらに肝発癌抑制法を開発し適用していくことで、これらの疾患の病態・肝発癌制御を試みる。具体的には、1) C型肝炎における代謝因子解明と発癌抑制法確立、2)

NASHの実態解明、病態解析と発癌抑制法確立、3) 非ASH非NASH非B非C型肝炎の実態解明、病態解析、高リスク群の設定、4) 糖尿病に発生する肝癌の病態解明と高リスク群設定、を臨床と基礎の両面から検討を行なう。

研究代表者小池は、H23年度まで『肝炎ウイルスと代謝・免疫系の相互作用に関する包括的研究』班でウイルス肝炎における代謝性変化の発生機序と肝発癌に対する影響を検討した。その結果、C型肝炎では、インスリン抵抗性や肝脂肪化が慢性肝炎進行を促進することを明らかにした。一方、小池が分担研究者であった『非アルコール性脂肪性肝疾患の病態解明と診断法、治療法の開発に関する研究』班(H20~H22年度、研究代表者岡上武)では、日本にNASHが多く存在し、肝癌の原因であることを明らかにした。これらの先駆的な研究班の成果を受けて、本研究班においてはC型肝炎肝発癌における代謝要因の解析、NASHの病態解析、非ASH非NASH非B非C型肝炎の解析を行ない、これらの肝癌発生の抑制を図った。

B. 方法

1) NASHの検討: 肝生検で診断した888例のNAFLDをMatteoni分類に従い組織学的にtype 1~4に分類し、脂肪蓄積、炎症、線維化の程度や患者背景・臨床検査成績を解析し、コントロール2524例を対象に網羅的遺伝子関連解析(GWAS)を施行した(京都大学ゲノム疫学解析センター松田文彦教授との共同研究)。またNASH肝癌58例でのGWASも行った。2. C型肝炎の

検討：肝生検で grade, stage, steatosis の程度などを解析した C 型肝炎 276 例を対象に、NAFLD の GWAS 検討で NASH 発症・進展の感受性遺伝子として同定された 22 番染色体上の遺伝子 patatin-like phospholipase domain containing 3(PNPLA3)の rs738409 の SNP 解析を Taq Man PCR で検討した。

(岡上 武)

2) 2000 年から 2014 年までに当科で経験した HCC に対し肝切除を施行された 385 例中、癌部組織の 60% 以上に steatohepatitis に特徴的な所見を認めた SH-HCC 20 例と、SH-HCC 例以外で年齢・性を SH-HCC 例とマッチさせた 20 例を臨床病理学的に比較した。病理学的には、非癌部の fibrosis stage と features of steatohepatitis の合併頻度、癌部の肉眼分類、分化度、組織型、脈管浸潤と胆管浸潤の有無を比較した。免疫組織学的検討としては、肝細胞マーカー；Hep-1、早期 HCC 関連マーカー；Glypican3, CD34、胆管細胞および肝前駆細胞マーカー；CK7,CK19、肝トランスポーター；OATP8、癌幹細胞自己増殖促進分子；Nanog、細胞分化・増殖抑制因子；リン酸化・非リン酸化 LKB-1 に関して、癌部での染色性を評価した。初回術後の無再発生存率は、Kaplan-Meier 法にて検討した。

(橋本悦子)

3) 2000 年から 2012 年までに本学で初回肝切除を施行した肝癌を対象として、背景肝疾患別に代謝関連因子などの臨床病理学因子の検討に基づき、癌部・非癌部組織の網羅的遺伝子発現解析を行った。非 B 非 C

型(NBNC)肝癌症例の肥満度および糖尿病に正相関する非癌部遺伝子群のクラスタ解析、遺伝子機能(gene ontology)パスウェイ解析によって、代謝関連遺伝子群を抽出した。さらに、培養ヒト肝癌細胞を用いた遺伝子発現解析によって検証を加え、代謝関連遺伝子を抽出した。遺伝子導入による in vitro, in vivo 機能解析の結果に基づき、臨床検体を用いた病理学的検証を行った。(田中真二)

4) 雄性 MC4RKO マウス 10 匹を高脂肪食で 4 ヶ月間飼育し、肝臓への炎症性細胞浸潤や線維化、肝発癌の有無を比較検討した。(西原利治)

5) 肝臓特異的 Sdf2l1 ノックアウトマウスの糖代謝・肝臓での ER ストレス・脂肪蓄積などを検討した。②消化器内科入院中の患者において、OGTT、肝生検を施行し、生検サンプルにおいて ER ストレス関連遺伝子の発現を解析した。糖尿病 NASH モデルマウスとして STAM マウスを用い、インスリン、フロリジン、ストレプトゾトシン投与にて NASH、肝癌の進展を解析した。(植木浩二郎)

6) (検討 1) aa70 Mutant 定量測定可能であった 151 例を対象として、代謝・宿主要因と aa70 Mutant 定量の関係を検討した。代謝要因からは総コレステロール・HDL コレステロール・LDL コレステロール・中性脂肪・空腹時血糖・Body mass index(BMI)、宿主要因からは *IL28B* 遺伝子多型・肝線維化マーカーの Fibrotic score for hepatitis C(FSC)を含む 15 個の因子を検討した。(検討 2) HCV RNA 持続陽性の状態から肝発癌した連続 43 例と、Sustained virological

response(SVR; 治療終了後 24 週経過時点の HCV RNA 陰性状態)後に肝発癌した連続 17 例を対象として、肝発癌例における aa70 Mutant 定量の経時変化を検討した。

(芥田憲夫)

7) NASH 関連肝がんモデルである STAM®マウス (株式会社 ステリック再生医科学研究所; 東京) を用いた。8 週齢の STAM®マウスに対し、sitagliptin 30mg/kg

(n = 8) もしくは蒸留水 (n = 8) をゾンデにより 1 日 1 回、10 週間連日投与した。全個体に対して実験期間中連日午前 9 時~11 時の間に生存を確認した。全個体に対して実験期間中連日午前 9 時~11 時の間に測定した。各ゲージにマウス 4 匹を飼育した (各群 2 ゲージ)。全ゲージにおいて、餌の交換時 (午前 9 時~11 時; 週 3 回) に摂餌量を測定した。肝腫瘍評価: CT 撮影: 16 週齢時に全個体についてネンブタールにて麻酔を施行したのち、肝臓を撮影した。その後、イオパミロン (Bayer Health Care AG) を尾静脈より投与し、再び肝臓を撮影した。造影後期相のみにて低吸収域として描出される結節を肝腫瘍と定義し、CT 解析ソフト

(Onis, DigitalCore. Co. Ltd.) を用いて肝腫瘍の個数と腫瘍の容積を評価した。18 週齢時に全個体を心採血により屠殺し、肝臓を摘出した。摘出した肝臓は電子天秤 (株式会社 島津製作所 AUW22D 型) を用いて肝重量を測定した。また、デジタルカメラを用いて肉眼的に肝外観の状態を評価した。(川口 巧)

8) 人工ヌクレアーゼを In vitro で合成した mRNA を導入することで発現させ、細胞をクローニングし、遺伝子解析することによって

ApoB または ApoE のノックアウト Huh7 細胞を樹立した。同時に、ApoB および ApoE のダブルノックアウト (DKO) 細胞も樹立した。それらの細胞に対する HCV の感染性を qRT-PCR および Focus forming assay によって検討した。レンチウイルスベクターによって種々のアポリポ蛋白を発現させ、HCV の粒子産生に対する影響を検討した。アポリポ蛋白の 2 次構造は CLC Genomics Workbench により予測した。ApoC1 および ApoE の欠損変異体を発現する DKO 細胞を作製し、HCV の感染性粒子産生における両親媒性の α ヘリックスの意義を検討した。最後にウイルス粒子を超遠心によって精製し、アポリポ蛋白のウイルス粒子への結合を検討した。遺伝子型 1 および遺伝子型 3 のキメラ HCVcc を作製し、アポリポ蛋白によるキメラウイルスの感染性への影響を検討した。

(松浦善治)

9) レプリコン細胞 SGR/Fluc-neo/JFH1 を用い、内在性 L-FABP の発現を siRNA でノックダウンし、HCV RNA 複製への影響をルシフェラーゼアッセイで解析した。HCV JFH1 を Huh-7 細胞に感染させ、内在性 L-FABP の発現を siRNA でノックダウンし、上清中への感染性 HCV 粒子の産生への影響を上清中の HCV 感染価の測定により解析した。HCV NS5A 上の HNF-1 α 結合領域を解析するために、NS5A の各種欠失変異体および点変異体を作製した。Huh-7.5 細胞にそれぞれを発現させ、両者の結合に重要な NS5A 上のアミノ酸を免疫沈降法で解析した。HNF-1 α 上の NS5A 結合領域を解析するために HNF-1 α の欠失変異体を作製した。Huh-7.5 細胞にそれぞれを発現させ、両者の結合に重要な HNF-1 α の領域を免疫沈降法で解析した。Huh-7.5 細胞に HCV J6/JFH1 を感染させ、HNF-1 α 分解誘導に対する NS5A 阻害剤

Daclatasvir の効果を解析した。

(勝二郁夫)

10) HCV core 蛋白発現細胞および transgenic mouse モデルを使用し鉄投与による酸化ストレスの増大と Ca uniporter 抑制による酸化ストレス抑制の有無を検討した。

(森屋恭爾)

11) 2004 年 1 月から 2009 年 12 月までに当院消化器内科で診断された 1,257 人の肝細胞癌患者の骨格筋量、筋肉内脂肪量、腹部脂肪量、腹部脂肪分布をコンピュータ断層撮影(CT)を用いて測定し、死亡をエンドポイントとして、体組成の構成要素それぞれの最適なカットオフ値を求めた。次にこのカットオフ値を用いた多変量解析にて個々の因子の独立性を検討した。最後に BMI と各因子との関係を分析し、BMI と肝癌の治療後の予後がなぜ V 字型になるのかを明らかにした。

(建石良介)

C.結果

1) 当初 NAFLD529 例に網羅的遺伝子関連解析 (GWAS) を行い *PNPLA3* の rs738409 の SNP(I148M)が NASH 発症・進展感受性遺伝子と報告したが (PLoS ONE 2012)、Matteoni type 3 の症例数が少なかったため、今回 NASH 肝癌 58 例を含む NAFLD397 例を追加し、888 例 NAFLD(control2525 例)と 58 例の NASH 肝癌で GWAS を行った。その結果 I148M は type 4 NASH に特異的(p-value 1.34×10^{-29} , HWE $p < 10^{-7}$)かつ発癌感受性遺伝子である事が判明した(p-value 1.7×10^{-9}) (論

文作成中)。I148M は C 型肝炎の線維化、脂肪蓄積にも関与している事も明らかになった(J Gastroenterol in press)。

(岡上 武)

2) SH-HCC と標準 HCC の臨床背景 : SH-HCC 群は標準 HCC 群に比し、背景とする肝疾患としてアルコール性肝障害 (ALD)と NAFLD が多く (合計で SH-HCC の 95% vs. 標準 HCC の 25%)、肥満あるいは生活習慣病を高率に合併 (SH-HCC での合計合併率 100% vs. 標準 HCC の 60%) し、これを反映し BMI 高値であった。原因別全症例中の SH-HCC の割合を図 1 に示す。NAFLD の 37%、ALD の 12%が典型的 SH-HCC であり、一方肝炎ウイルス感染を基盤とする HCC では、典型的 SH-HCC 合併率は 1%未満と低率であった。

SH-HCC と標準 HCC の病理学的比較 : 対象とした 2 群の肉眼所見・非癌部組織・癌部の分化度・組織型を表 2 に示す。両群で差異を認めた事項は、SH-HCC は発癌時主腫瘍径が有意に大きく (中央値 35mm vs. 20mm)、非癌部 steatohepatitis 合併率が高率 (85% vs. 10%) であることのみであった。脈管浸潤合併は 40% vs. 35%、胆管浸潤合併は 10% vs. 10%と両者に有意差は無かった。対象とした 2 群の癌部の免疫組織染色陽性率を表 3 に示す。有意差を認めたのは、SH-HCC 群で Nanog 陽性率が高く (80% vs. 20%)、癌部の強陽性例 SH-HCC 典型例の 5 例に認めるのみであった。

SH-HCC と標準 HCC の無再発生存率 : 5 年無再発生存率に有意差はなかった (52% vs. 41%) が、注目すべき事項として、初回

肝切除術施行時の主腫瘍径が 50mm 以上で術後 5 年無再発生存例は、SH-HCC でのみ 3 例認めた。

(橋本悦子)

3) NBNC 肝癌は C 型肝炎に比べて有意に男性に多く、B 型肝炎に比べて高齢発症であり、背景肝は肝硬変が少なかった。また NBNC 肝癌では、肥満、糖尿病、高血圧、高脂血症、アルコール多飲といった代謝関連因子の割合が、B 型肝炎・C 型肝炎に比べて何れも有意に高かった ($p < 0.005$)。NBNC 肝癌症例の網羅的遺伝子発現解析の結果、肥満度および糖尿病と正相関する非癌部発現遺伝子群として、90 遺伝子を抽出した。その遺伝子機能パスウェイ解析では細胞接着、細胞骨格、インテグリンシグナル、血管発生などと有意な相関を認め ($p < 0.01$)、発現および機能の検証によって *SLAMF7*, *CTGF*, *ITGBL1*, *LIMA1* の 4 遺伝子を抽出した。培養ヒト肝癌細胞を用いた 4 遺伝子の発現解析では、糖およびインスリン付加によって相乗的に *CTGF* 遺伝子が発現亢進することを見出した。遺伝子導入によって作成した *CTGF* 高発現株では *in vitro* 増殖能には変化を認めなかったが、網羅的遺伝子発現解析・パスウェイ解析によってケモカイン関連遺伝子群の高発現と相関することを見出した ($p < 0.0001$)。 *CTGF* 高発現株は *in vitro* マクロファージ遊走能、NF- κ B 活性化を惹起することを確認した。 *CTGF* 高発現株を用いた *in vivo* 同所性肝腫瘍モデルでは、腫瘍増殖の亢進 ($p = 0.032$) および集簇マクロファージの NF- κ B 活性化を検出した ($p = 0.02$)。さらに肝癌臨床検体を用いた病理組織学的解析の

結果、糖尿病と肥満を有する症例の非癌部肝細胞お

4) よび星細胞に *CTGF* 蛋白が有意に高発現し ($p = 0.049$)、 *CTGF* 陽性糖尿病症例では非癌部肝のマクロファージ・クッパー細胞における NF- κ B 活性化を認めた ($p = 0.01$)。非癌部 *CTGF* 陽性症例は陰性症例に比べて有意に無再発生存率が低下した ($p = 0.041$)。

(田中真二)

5) *MC4RKO* マウスは高インスリン血症とともに過食を生じ、高度肥満を呈する。 *MC4RKO* マウスでは脂肪肝の進展と共に、炎症性細胞浸潤に加えて肝線維化が生じる。今回の検討でも、肝細胞の脂肪化の強い小葉中心部から最初の線維化は始まった。しかし、その部位は中心静脈の血管内皮直下ではなく、中心静脈を鞘状に包み込むように血管内皮から肝細胞数個分離された部位の星細胞の活性化がまず選択的に生じ、細かな線維化巣の形成が小葉中心と小葉辺縁の 2 方向に向けて伸展することが明らかになった。この様式は肝炎ウイルス感染症における肝臓の線維化伸展様式と明らかに異なる未知の線維化機序であり、同じく中心静脈領域から線維化が伸展するとされるアルコール性肝障害の線維化過程との異同を明らかにする必要がある。

(西原利治)

6) ①肝臓特異的 *Sdf2l1* ノックアウトマウスは、耐糖能障害を呈しており、肝臓の脂肪蓄積も増加していた。 *Sdf2l1* の ER ストレス終息作用は、BIP と協調して増大することが判明した。②糖尿病患者の肝臓では、XBP-1, BIP, CHOP, *Sdf2l1* など ER ストレス終息シグナルの発現が低下しているほど、

NASH の進展が認められた。③インスリンやフロリジンの治療で、STAM マウスの NASH 進展が抑制されることが判明した。

(植木浩二郎)

7) (検討 1) aa70 Mutant 定量値が増加している症例では *IL28B* rs8099917 non TT の頻度が高く、肝線維化進行例(FSC4)の頻度も高くなる傾向が確認され(P<0.001; Chi-squared test)、aa70 Mutant 定量は宿主要因と関連しながら経時的に変化する可能性が示唆された。更に、aa70 Mutant 定量値の増加に伴い AFP 値も増加する傾向が確認され(P=0.003; Kruskal Wallis test)、aa70 Mutant 定量は肝発癌の一指標として有用な可能性が示唆された。(検討 2) HCV RNA 持続陽性の状態からの肝発癌例における aa70 Mutant 定量中央値の推移は、発癌 10 年前 30%、発癌 5 年前 65%、発癌 1 年前 80%。肝発癌例の aa70 Mutant 定量値は経時的に増加傾向を示した。この様に定量法で経時的に定量推移を評価することが肝癌危険群の早期指摘に有用な可能性がある。初診時背景因子の中で、総コレステロール高値(P=0.059)、LDL コレステロール高値(P=0.007)、HDL コレステロール低値(P=0.012)、BMI 高値(P=0.035)の症例では aa70 Mutant 変化量が大きい傾向が確認された(Chi-squared test)。特に、初診時 BMI は aa70 Mutant 変化量と正の相関を示す傾向が確認された($r=0.539$, P=0.001; Spearman rank correlation test)。この様に脂質要因が aa70 Mutant 変化量に影響する可能性が示唆された。SVR 後に肝発癌した症例における aa70 Mutant 定量中央値の推移は、SVR5 年前 45%、SVR 直前

95%。SVR 後肝発癌例の aa70 Mutant 定量値も経時的に増加傾向を示した。SVR 前で最終治療時の HDL コレステロール値は aa70 Mutant 定量値と負の相関を示す傾向が確認された($r=-0.824$, P<0.001; Spearman rank correlation test)。更に、肝発癌までの期間に影響する要因を検討すると、空腹時血糖が高い症例(P=0.004)、aa70 Mutant 定量が多い症例(P=0.045)で肝発癌までの期間が短い傾向にあった(Mann-Whitney U test)。この様に代謝要因とウイルス要因が SVR 後肝発癌例の発癌期間に影響する可能性が示唆された。

(芥田憲夫)

8) Vehicle 群および Sitagliptin 群、いずれの群においても実験終了時まで死亡した個体は認めなかった。観察期間中を通して、Vehicle 群と Sitagliptin 群の間に体重の有意な差は認めなかった。観察期間中を通して、Vehicle 群と Sitagliptin 群の間に摂餌量の有意な差は認めなかった。肝重量・肝体重比については、Vehicle 群と Sitagliptin 群の間に 18 週齢時の肝重量に有意差は認めなかったが、Sitagliptin 群の肝体重比は Vehicle 群と比較し有意に低値であった ($P < 0.01$)。18 週齢時、Vehicle 群の肝組織には中心静脈周囲の肝細胞に著名な脂肪滴の沈着が認められた。一方、Sitagliptin 群は、Vehicle 群と比較して肝細胞における脂肪滴の沈着が抑制されていた 18 週齢時、Sitagliptin 群の NAS は、Vehicle 群と比較して有意に低値であった。Sitagliptin 群の肝腫瘍は Vehicle 群と比較して、腫瘍径が小さく、腫瘍数が少なかった。

た。Vehicle 群と Sitagliptin 群の間で、肝腫瘍が発生した個体数に有意差は認めなかったが、Sitagliptin 群の腫瘍数と腫瘍容積は Vehicle 群と比較して有意に低値であった。

(川口 巧)

9) ApoE または ApoB のノックアウト細胞はワイルドタイプ (WT) の Huh7 と同等の感染性粒子の産生能を示したが、DKO 細胞では感染性粒子産生能が顕著に抑制されており、ApoB および ApoE が HCV の感染性粒子産生において、相補的な役割を演じていることが示唆された。cDNA マイクロアレイの結果より、肝組織と Huh7 細胞におけるアポリポ蛋白の発現パターンが大きく異なることが判明した。ApoB および ApoE の発現は同等であるにも関わらず、ApoA や ApoC の発現が Huh7 細胞で抑制されていた。そこで、HCV の粒子産生における ApoA や ApoC の役割を解析するために、DKO 細胞において ApoA1、ApoA2、ApoC1、ApoC2、ApoC3、ApoE および ApoH を発現させ、粒子産生能を検討した。興味深いことに、ApoE のみならず ApoA および ApoC によっても HCV の感染性粒子の産生が可能になることが明らかになった。種々のアポリポ蛋白が共通した機能を保持する機構を明らかにするために、アポリポ蛋白の 2 次構造を予測した。興味深いことに、HCV の粒子産生を可能にする ApoA、ApoC よび ApoE は共通した両親媒性 α ヘリックスを複数、有することが明らかになった。さらに、ApoC1 および ApoE の単一の α ヘリックスを発現させた DKO 細胞においても、HCV の粒子産生能が回復してい

たことから、アポリポ蛋白に存在する両親媒性の α ヘリックスが HCV の感染性粒子の産生に関与していることが示唆された。さらに、超遠心にてウイルスを濃縮し、アポリポ蛋白を検出したところ、ウイルス粒子とともに濃縮されたことから、ウイルス粒子にアポリポ蛋白が結合していることが示唆された。遺伝子型 1 および遺伝子型 3 のキメラウイルスの粒子産生は ApoB および ApoE の共欠損によって、顕著に抑制されたことから、アポリポ蛋白質は JFH1 株のみならず、様々な遺伝子型の HCV 粒子産生に重要な役割を演じていることが示唆された。

(松浦善治)

10) HCV J6/JFH1 を感染させた Huh-7.5 細胞では L-FABP の mRNA レベルが感染後 2 日、4 日、6 日と経時的に減少し、それに伴い L-FABP の蛋白レベルは著明に減少した。HCV レプリコン細胞 SGR/Fluc-neo/JFH1 の内在性 L-FABP の発現を siRNA でノックダウンしたところ、HCV RNA 複製はコントロール siRNA の場合とほとんど変化なく、複製への影響はみられなかった。HCV JFH1 を Huh-7 細胞に感染させ、内在性 L-FABP の発現を siRNA でノックダウンしたところ、上清中の HCV 感染価が上昇した。HCV NS5A 上の aa 121-126 が HNF-1 α 結合に重要で、V121A 変異体では両者の結合が消失した。HNF-1 α aa 91-181 を欠失させると NS5A との相互作用が消失し、HNF-1 α aa 91-181 だけ発現させると NS5A と相互作用を示したことから、HNF-1 α 上の POU_s domain が NS5A との結合に重要であるこ

とが示唆された。Huh-7.5 細胞に HCV J6/JFH1 を感染させ、Daclatasvir を培養液中に添加すると HNF-1 α の量が回復し、NS5A による HNF-1 α の分解誘導が阻害された。

(勝二郁夫)

11) HCV core 蛋白は Ca uniporter を介して mitochondria 内への鉄輸送をもたらす mitochondria 障害 (膜電位変化) により fenton 反応を介して酸化ストレスをもたらすことが判明した。Ca uniporter の阻害薬により酸化ストレス産生は抑制された。

(森屋恭爾)

12) BMI 20.0~24.9kg/m² の通常体重群に比し低体重群、肥満群ともに治療後の予後が不良であった。予後をエンドポイントとして、骨格筋量 (cm²/m²)、内臓脂肪量 (cm²/m²)、内臓/皮下面積比、筋内脂肪量 (HU) のカットオフ値をそれぞれ男女別に決定した。それぞれ、骨格筋量が少ないほど、内臓/皮下脂肪面積が大きいほど、筋内脂肪量が多いほど有意に予後不良であった。次に体組成の構成要素と BMI の関係を検討したところ、低体重群に骨格筋量の少ない「サルコペニア」が多く含まれ、肥満群では、内臓脂肪、筋内脂肪が有意に多いことが判明した。

(建石良介)

D. 考察

1) Matteoni らは NAFLD を組織学的に 4 つの type に分類し、予後の解析から type 1,2 が NAFL で type 3,4 が NASH と分類した。NAFLD の 20%前後が NASH に進展すると言われているが NAFLD から NASH

へ進展や NASH 発症・進展の遺伝的要因は充分明らかになっていなかった。今回肝生検で診断した多数例の NAFLD を対象に GWAS を行い、遺伝的には type 3 は type 1, type 2 と同じで、典型的な NASH である type 4 の発症・進展と発癌に *PNPLA3* の SNP が深く関与していることが明らかになった。また C 型肝炎では 40%以上に脂肪蓄積が見られ、脂肪蓄積は線維化進展例に多いが、*PNPLA3* (rs738409) の SNP が C 型肝炎における脂肪蓄積と線維化進展に関与していることが明らかになった。

(岡上 武)

2) SH-HCC 典型例は NAFLD-HCC の 36%、ALD-HCC の 12%、HCV-HCC の 1%に認められた。SH-HCC の背景肝疾患は脂肪性肝疾患が主体であり、肥満・生活習慣病が関与する可能性が示唆された。SH-HCC は標準 HCC に比し、主腫瘍径が大きいにもかかわらず脈管浸潤・胆管浸潤は同程度で、術後無再発生存率は同等であったが、直径 50mm 以上の術後 5 年無再発例および癌部 Nanog 高発現例は SH-HCC 典型例でのみ認められた。今回の自験例の検討でも HCC 無再発生存率は SH-HCC 典型例と標準 HCC 例とで差異を認めなかった。しかし、主腫瘍径は標準 HCC より有意に大きいものにも拘わらず、脈管浸潤と胆管浸潤、HCC 無再発生存率が同等であったこと、巨大 HCC 術後無再発例の存在、Nanog 発現の差異などから、癌腫としての動態が通常 HCC とは異なる可能性も示唆される。SH-HCC 典型例を多数例集積し、再発や予後など生物学的動態に関連する事項を中心に、更なる検討が必要と考える。

(橋本悦子)

3) NBNC 肝癌症例は代謝関連因子と相関が高く、網羅的遺伝子発現解析の結果、ウイルス性肝癌と異なった特異的遺伝子機能異常が内在している可能性が示された。本研究では糖尿病および肥満と正相関する非癌部遺伝子群から、培養細胞を用いた検証によって代謝関連遺伝子として CTGF を同定した。CTGF (connective tissue growth factor) は線維化、炎症など間質反応に関与する CCN ファミリーに属する分泌タンパクであり (*J Cell Biol* 1991)、我々は遺伝子クローニングによって CCN ファミリーが癌進展に関与することを報告している (Tanaka et al. *Oncogene* 1999, *Gastroenterology* 2002, 2003, *Hepatology* 2003)。CTGF はヒト肝癌細胞の *in vitro* 増殖能には関与しないが、ケモカイン発現亢進によってマクロファージ活性化、遊走能を促し、*in vivo* 解析ではオートクラインよりもむしろパラクライン機序によるマクロファージ活性化を伴った肝癌腫瘍の有意な増殖促進が示唆された。さらに臨床検体を用いた検証によって非癌部肝 CTGF 蛋白発現と肝癌再発が有意に相関することが示されており、NBNC 代謝関連肝癌の再発予測バイオマーカーとして有用であるばかりでなく、治療標的となりうる可能性が示唆された。今後、糖尿病による肝組織での CTGF 発現機序および癌微小環境相互作用の解明に加え、大規模臨床検体を用いた validation study が必要である。

(田中真二)

4) MC4R 遺伝子に異常が生じるとマウスでもヒトと同様に幼児期より高度肥満を呈

する。MC4R 遺伝子変異を持つこれらの症例は遺伝性 NASH を発症し、しばしば肝硬変で死亡することが知られている。従って、この遺伝性疾患を研究すれば非遺伝性 NASH で観察される代謝異常に近い病態を知ることができるのではないかと考えられる。今回、中心静脈周囲性の肝細胞を取り囲む特徴的な pericellular fibrosis がどのように形成されるか、MC4RKO マウスであきらかになったので、この成績がヒトに外挿可能であれば、pericellular fibrosis を標的とする治療法の開発は NASH 治療の新たな option に繋がるのではないかと考えられた。

(西原利治)

5) これまでの検討から、Sdf2l1 は、肝臓において BIP と協調して、ER ストレスを終息させると考えられる。その発現誘導は、肝臓でのインスリンシグナルが十分にあることが必要であり、Sdf2l1 の発現低下がインスリン作用を低下させるという悪循環を形成していることが、マウスおよびヒト検体の解析から示唆された。糖尿病 NASH モデルマウスについては、血糖値の改善が NASH の進展を抑制していることが示唆され、肝癌進展の抑制には肝臓での適正なインスリン作用の改善も必要である可能性も示唆された。

(植木浩二郎)

6) トランスジェニック・マウスによる動物実験では HCV core 蛋白による肝細胞脂肪化・インスリン抵抗性といった脂質/糖代謝への影響やそれらを介した肝発癌への影響が報告されてきた。当施設の検討は、この様な基礎的な検討を臨床面から支持する

成績であるといえる。今回の肝発癌例のみの検討では、肝発癌の10年前より既に aa70 Mutant 定量値が増加傾向を示し、その変化量には代謝要因の関与が示唆された。更に、SVR 後発癌例でもウイルス排除前の aa70 Mutant 定量値は経時的に増加傾向を示し、代謝・ウイルス要因が肝発癌期間に影響する可能性が示唆された。この様な、ウイルス排除前の Core アミノ酸置換の状態が SVR 後肝発癌にまで影響するという成績は、イニシエーターとしての HCV が排除される前段階で既に aa70 Mutant の症例では肝発癌の素地が出来上がっている可能性を示唆する所見と思われる。即ち、Core アミノ酸置換は肝発癌の Surrogate marker としての役割を担っている可能性があるといえる。今後は、aa70 Mutant 定量値の推移に影響している代謝要因も加味しながら総合的にウイルス・代謝・宿主要因と肝発癌との関係性を評価していく必要がある。更に、今回の検討はあくまで肝発癌例のみの検討であるため、今後は更に症例数を増やして、非発癌例における aa70 Mutant 定量値の経時変化の経過とも比較していく必要がある。

(芥田憲夫)

7) 本研究により、DPP4 阻害剤である sitagliptin は、NASH 関連肝がんマウスモデルにおける肝細胞の脂肪沈着を抑制した。また、sitagliptin は、同モデルマウスの肝発がんに対し抑制的に作用することが明らかとなった。DPP4 阻害剤である sitagliptin は、NASH 関連肝がんマウスモデルにおける肝細胞の脂肪沈着を抑制した。本研究では sitagliptin による脂肪肝抑制の

機序は明らかではないが、DPP4 阻害剤の投与により本マウスモデルの活性型 GLP-1 濃度は上昇していると考えられる。これまでに、GLP-1 アナログ製剤は ob/ob マウスのインスリン抵抗性と脂肪肝を改善することが報告されている (Ding X et al. *Hepatology*. 2006;43:173-81.)。また、肝細胞には GLP-1 受容体が発現していることも報告されている (Gupta NA et al. *Hepatology*. 2010;51:1584-92.)。さらに、我々は、基礎的研究にて GLP-1 が肝細胞の脂肪分解に関わる AMP キナーゼを活性化しインスリン抵抗性を改善することを明らかにしてきた。以上の研究結果より、DPP4 阻害剤は GLP-1 の作用を増強し、NASH 関連肝がんマウスモデルにおける肝細胞への脂肪沈着を抑制することが推察される。Sitagliptin は、NASH 関連肝がんマウスモデルの肝発がんに対し抑制的に作用した。sitagliptin による脂肪肝抑制の機序は明らかではないが、DPP4 阻害剤は前述のごとく活性型 GLP-1 濃度は上昇させ、インスリン抵抗性を改善していると考えられる。インスリンは細胞増殖作用を有するホルモンであり、インスリン抵抗性は肝発がんのリスクファクターである。以上より、DPP4 阻害剤はインスリン抵抗性を是正することで肝発がんに抑制的に作用すると考えられる。また、Stecca らはヒト肝癌組織中の DPP4 の発現が亢進していることを報告している (*J Hepatol*. 1997;27:337-45)。DPP4 は血管新生の開始と維持に必要な分子であり、DPP4 阻害剤は血管新生の抑制を介して肝腫瘍に対して抑制的に作用することが推察される。

(川口 巧)

8) 今回の検討により、ApoA、ApoB、ApoC および ApoE が両親媒性の α ヘリックスとウイルス粒子の結合を介して、HCV の感染性粒子の産生を可能にしていることが明らかとなった。相補的な機能をお互いに保持することから、アポリポ蛋白は抗ウイルス治療の標的に成り難い。また、ApoA と ApoE はそれぞれ HDL および VLDL に高い特異性を持って結合するが、HCV 粒子産生においては、ApoA も ApoE も同様の機能を保持していた。今後は、アポリポ蛋白がどのような機構で HCV の粒子産生に関わっているのかを明らかにしたい。

(松浦善治)

9) HNF-1 α 不活化による肝アデノーマで HNF-1 α の標的遺伝子の L-FABP の転写抑制が起こり、著明な肝脂肪化、糖代謝異常が起こることが知られている。HCV 感染ではライソソーム依存性に HNF-1 α の分解が促進される。それに伴い L-FABP の転写抑制が起こり、蛋白レベルでも著明な減少をした。L-FABP は脂肪酸と結合し、脂肪酸を細胞内の脂肪滴、ペロキシソーム、ミトコンドリアなどに輸送する。L-FABP の発現量が著明に減少すると脂肪酸の輸送に障害が起こると考えられ、これが脂肪滴の貯留や肝脂肪化につながると考えられた。L-FABP 量を siRNA によりノックダウンさせると、感染性ウイルス粒子の産生量が上昇した。これは L-FABP の減少は HCV 感染性粒子の産生に有利であることを示唆しており、HCV が HNF-1 α の量を減少させ、L-FABP 量を減少させることにより、ウイルス産生に有利な環境を作っていることが

示唆された。L-FABP のウイルス産生における役割については、今後さらに解析する必要がある。HCV NS5A の Val121 が HNF-1 α との結合および分解に重要であることが示された。以前、NS5A Val121 が FKBP8 との相互作用に重要で HCV 複製制御に深く関与することが報告されているが、同じアミノ酸が別の宿主因子 HNF-1 α との相互作用にも必須であり、病原性に関与することが示唆された。また、NS5A 阻害剤の Daclatasvir は HCV 複製を抑制し、HNF-1 α の量は回復するので、NS5A-HNF-1 α を介した代謝異常に Daclatasvir が有効であることが示唆された。今後、臨床的に Daclatasvir 使用で糖脂質代謝が改善するか解析する必要がある。

(勝二郁夫)

10) HCV core 蛋白と mitochondria 内の鉄による酸化ストレス増大機序が示され HCV 発癌抑制薬剤の候補が得られた。

(森屋恭爾)

11) 低体重群では、内臓肥満や筋内脂肪が少ない一方で、予後不良のサルコペニアが多く含まれることで、通常体重群よりも予後が悪くなっていることが考えられる。

(建石良介)

E. 自己評価

達成度について：当初設定した目標について、ほぼ各項目について3年目の目標通りに研究が遂行されたと考える。

研究成果の学術・国際・社会的意義について：全国的な非 B 非 C 型肝炎の増加の中、代謝関連肝癌として捉えて研究、診断、治療を行なうというコンセプトのもつ社会的

な意義は大きいと考えられる。

今後の展望について：代謝関連肝癌 (MALC) に関して、臨床データ、基礎実験を通じて、発癌機序の解明、抗リスク群の設定等、早期発見、早期治療に向けた取り組みの成果が期待される。

F. 結論

非 B 非 C 型肝癌の階層化クラスタリング解析によって、従来言われている NASH やアルコール性肝硬変以外に肝機能正常・高齢男性や肥満と飲酒のリスクを併せ持つ集団など新たな背景集団を抽出することができた。C 型肝炎、NASH、非 ASH 非 NASH の非 B 非 C 型肝疾患に関連する肝癌を、「代謝関連肝癌 (Metabolism-associated liver cancer, MALC)」として捉えて解析を行ない、その病態を探り、高リスク群を設定し、さらに肝発癌抑制法を開発し適用していくことで、これらの疾患の病態・肝発癌制御が可能になると考えられた。この様な認識をもって患者の管理・治療に当ることにより、患者の予後、QOL を大幅に改善することが期待される。

G. 健康危険情報

なし

H. 研究発表

論文発表のみ

1) Watanabe Y, Yamamoto H, Oikawa R, Toyota M, Yamamoto M, Kokudo N, Tanaka S, Aii S, Yotsuyanagi H, Koike K, Itoh F. DNA methylation at hepatitis B viral integrants is associated with methylation at flanking human genomic sequences. *Genome*

Res 2015 Feb 4. pii: gr.175240.114. [Epub ahead of print] PubMed PMID:25653310.

2) Fujiwara N, Nakagawa H, Kudo Y, Tateishi R, Taguri M, Watadani T, Nakagomi R, Kondo M, Nakatsuka T, Minami T, Sato M, Uchino K, Enooku K, Kondo Y, Asaoka Y, Tanaka Y, Ohtomo K, Shiina S, Koike K. Sarcopenia, Intramuscular Fat Deposition, and Visceral Adiposity Independently Predict the Outcomes of Hepatocellular Carcinoma. *J Hepatol* 2015 Feb 24. pii: S0168-8278(15)00141-5. Doi:10.1016/j.jhep.2015.02.031. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 25724366.

3) Minami T, Tateishi R, Shiina S, Nakagomi R, Kondo M, Fujiwara N, Mikami S, Sato M, Uchino K, Enooku K, Nakagawa H, Asaoka Y, Kondo Y, Yoshida H, Koike K. Comparison of improved prognosis between hepatitis B- and hepatitis C- related hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res*. 2015 Jan 6. doi: 10.1111/hepr.12468. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 25559860.

4) Sekine S, Ito K, Watanabe H, Nakano T, Moriya K, Shintani Y, Fujie H, Tsutsumi T, Miyoshi H, Fujinaga H, Shinzawa S, Koike K, Horie T. Mitochondrial iron accumulation exacerbates hepatic toxicity caused by hepatitis C virus core protein. *Toxicol Appl Pharmacol* 2014 Dec 26. pii: S0041-008X(14)00442-6. doi:10.1016/j.taap.2014.12.004. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 25545986.

5) Fujiwara N, Tateishi R, Nakagawa H, Nakagomi R, Kondo M, Minami T, Sato M, Uchino K, Enooku K, Kondo Y, Asaoka Y, Shiina S, Yoshida H, Koike K. Slight elevation of high sensitivity C-reactive protein to predict recurrence and survival in patients with early stage hepatitis C-related hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res* 2014 Jul 29. doi: 10.1111/hepr.12398. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 25070147.

6) Tateishi R, Okanoue T, Fujiwara N, Okita K, Kiyosawa K, Omata M, Kumada H, Hayashi N, Koike K. Clinical characteristics, treatment, and prognosis of non-B, non-C hepatocellular carcinoma: a large retrospective multicenter cohort study. *J*

- Gastroenterol 2014 Jun 15. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24929638.
- 7) Mikami S, Tateishi R, Hagiwara S, Sato M, Minami T, Uchino K, Enooku K, Sato T, Nakagawa H, Masuzaki R, Asaoka Y, Kondo Y, Shiina S, Ikeda H, Omata M, Yoshida H, Koike K. Tumor markers are more useful in patients undergoing surveillance for hepatocellular carcinoma with unreliable results by ultrasonography. *Hepatol Res* 2014 May 26. doi: 10.1111/hepr.12365. [Epub ahead of print] PubMed PMID:24861870.
 - 8) Sato M, Hikita H, Hagiwara S, Sato M, Soroida Y, Suzuki A, Gotoh H, Iwai T, Kojima S, Matsuura T, Yotsuyanagi H, Koike K, Yatomi Y, Ikeda H. Potential associations between perihepatic lymph node enlargement and liver fibrosis, hepatocellular injury, or hepatocarcinogenesis in chronic hepatitis B virus infection. *Hepatol Res* 2014 May 22. doi: 10.1111/hepr.12361. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24849617.
 - 9) Sato M, Tateishi R, Yasunaga H, Horiguchi H, Yoshida H, Fushimi K, Koike K. Variceal hemorrhage - Analysis of 9987 cases from a Japanese nationwide database. *Hepatol Res* 2014 May 14. doi: 10.1111/hepr.12357. [Epub ahead of print]
 - 10) Nakagawa H, Fujiwara N, Tateishi R, Arano T, Nakagomi R, Kondo M, Minami T, Sato M, Uchino K, Enooku K, Asaoka Y, Kondo Y, Shiina S, Yoshida H, Koike K. Impact of serum levels of IL-6 and adiponectin on all-cause, liver-related, and liver-unrelated mortality in chronic hepatitis C patients. *J Gastroenterol Hepatol* 2015;30(2):379-388.
 - 11) Fujiwara N, Tateishi R, Kondo M, Minami T, Mikami S, Sato M, Uchino K, Enooku K, Masuzaki R, Nakagawa H, Kondo Y, Asaoka Y, Shiina S, Yoshida H, Koike K. Cause-specific mortality associated with aging in patients with hepatocellular carcinoma undergoing percutaneous radiofrequency ablation. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2014;26(9):1039-1046.
 - 12) Shibata C, Otsuka M, Kishikawa T, Ohno M, Yoshikawa T, Takata A, Koike K. Diagnostic and therapeutic application of noncoding RNAs for hepatocellular carcinoma. *World J Hepatol* 2015 Jan 27;7(1):1-6.
 - 13) Masaki N, Sugiyama M, Shimada N, Tanaka Y, Nakamuta M, Izumi N, Watanabe S, Tsubota A, Komatsu M, Masaki T, Enomoto N, Yoneda M, Murata K, Ito K, Koike K, Mizokami M. Pretreatment prediction of the outcome of response-guided peginterferon- α and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *J Gastroenterol Hepatol* 2014 Dec;29(12):1996-2005.
 - 14) Ohno M, Otsuka M, Kishikawa T, Shibata C, Yoshikawa T, Takata A, Muroyama R, Kowatari N, Sato M, Kato N, Kuroda S, Koike K. Specific delivery of microRNA93 into HBV-replicating hepatocytes downregulates protein expression of liver cancer susceptible gene MICA. *Oncotarget* 2014 Jul 30;5(14):5581-90.
 - 15) Fukuhara T, Wada M, Nakamura S, Ono C, Shiokawa M, Yamamoto S, Motomura T, Okamoto T, Okuzaki D, Yamamoto M, Saito I, Wakita T, Koike K, Matsuura Y. Amphipathic α -helices in apolipoproteins are crucial to the formation of infectious hepatitis c virus particles. *PLoS Pathog* 2014 Dec 11;10(12):e1004534. doi: 10.1371/journal.ppat.1004534. eCollection 2014 Dec..
 - 16) Nakagawa H, Umemura A, Taniguchi K, Font-Burgada J, Dhar D, Ogata H, Zhong Z, Valasek MA, Seki E, Hidalgo J, Koike K, Kaufman RJ, Karin M. ER Stress Cooperates with Hypernutrition to Trigger TNF-Dependent Spontaneous HCC Development. *Cancer Cell* 2014;26(3):331-343.
 - 17) Asaoka Y, Tateishi R, Nakagomi R, Kondo M, Fujiwara N, Minami T, Sato M, Uchino K, Enooku K, Nakagawa H, Kondo Y, Shiina S, Yoshida H, Koike K. Frequency of and predictive factors for vascular invasion after radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma. *PLoS One* 2014 Nov 14;9(11):e111662. doi:10.1371/journal.pone.0111662. eCollection 2014.
 - 18) Yamazaki T, Mori M, Arai S, Tateishi R, Abe M, Ban M, Nishijima A, Maeda M, Asano T, Kai T, Izumino K, Takahashi J,